

INFLUENCE D'UNE BACTÉRIE *PSEUDOMONAS*
SUR LA CROISSANCE ET LA REPRODUCTION
D'UN CHAMPIGNON DISCOMYCÈTE
SCUTELLINIA UMBRARUM

par J.P. SCHRANTZ*

RÉSUMÉ. — Le *Scutellinia umbrarum* produit des chlamydo-spores et des apothécies fertiles lorsqu'il est cultivé avec un *Pseudomonas*. Le mycélium pur, récemment séparé de la colonie bactérienne, produit des chlamydo-spores et des apothécies stériles. Il devient complètement stérile au deuxième repiquage. La croissance pondérale du mycélium contaminé, comparée à celle du mycélium pur, est fortement inhibée. Au contraire la colonie bactérienne se développe mieux en compagnie du champignon. Elle supprime la zonation et les caroténoïdes qui apparaissent dans les cultures de mycélium pur. Le rôle possible des caroténoïdes est discuté. L'examen microscopique des cultures montre que le *Pseudomonas* entraîne une diminution du développement mycélien, une baisse des réserves (lipides et glycogène) et la mort d'un grand nombre d'articles. Les bactéries sont liées aux parois, elles ne pénètrent pas dans les hyphes vivantes. Les caractéristiques ultrastructurales des hyphes ne sont pas modifiées. Le *Pseudomonas* se comporte comme un antagoniste du *Scutellinia*.

SUMMARY. — *Scutellinia umbrarum* produces chlamydo-spores and fertile apothecia when it is cultivated with *Pseudomonas* sp. The pure mycelium, recently separated from the bacterial colony, produces chlamydo-spores and sterile apothecia. It becomes entirely sterile at the second transplanting. The ponderal growth of the contaminated mycelium, compared with that of pure mycelium, is strongly inhibited. On the contrary the bacterial colony grows better when it is in the presence of the fungus. Bacteria removes zonation and carotenoids which appear in cultures of pure mycelium. The possible role of carotenoids is discussed. The microscopic study of cultures shows that *Pseudomonas* induces decrease of fungal growth, decline of lipids and glycogen, and death of numerous hyphae. Bacteria are fixed at the wall of hyphae, they do not enter into living hyphae. The ultrastructural features of hyphae are not modified. *Pseudomonas* behaves like an antagonist of *Scutellinia*.

MOTS CLÉS : Discomycètes, culture, reproduction sexuée, chlamydo-spores, *Pseudomonas*, *Scutellinia*, interaction bactérie - champignon.

* Université Pierre et Marie Curie (Paris 6) UER 59. Laboratoire de Biologie Végétale, 77300 Fontainebleau, France.

INTRODUCTION

Dans une publication antérieure (SCHRANTZ, 1980) nous avons signalé la production d'apothécies et de chlamydo-spores par un *Scutellinia* (Discomycète) cultivé *in vitro* en présence de plusieurs bactéries parmi lesquelles un *Aeromonas* et un *Arthrobacter* avaient pu être isolés. Par son caractère original cette association nous a paru intéressante à étudier notamment afin de déterminer les rapports existant entre les partenaires. De telles associations sont peu connues. Dans le cas des Ascomycètes, MOLLIARD (1903) avait observé que les *Ascobolus* ne produisaient des fructifications que lorsque les cultures étaient contaminées par des bactéries. Il souligna l'importance de cette association au point de vue théorique et pratique, mais malheureusement ces expériences ne furent pas poursuivies, sans doute parce que les *Ascobolus* se cultivent et fructifient facilement sur des milieux naturels et synthétiques (Van BRUMMELEN, 1967). On trouve d'autres cas où la reproduction d'un champignon est seulement stimulée par un autre microorganisme (SARTORY, 1916, 1918; McCORMICK, 1925; WILSON, 1927; ASTHANA & HAWKER, 1936). Dans le cas des Basidiomycètes PARK & AGNIHORTI (1969) ont montré que plusieurs bactéries du sol stimulaient la production des carpophores de l'*Agaricus bisporus*.

Plus récemment AL-ALI & al. (1979) en cherchant à mettre au point une méthode de lutte biologique contre l'*Helminthosporium teres*, parasite de l'orge, ont rencontré plusieurs champignons ayant une bonne action inhibitrice sur la croissance mycélienne de ce champignon mais induisant la formation de périthèces ou de chlamydo-spores.

Notre travail a d'abord consisté à rechercher si toutes les souches bactériennes isolées avaient la même action sur le *Scutellinia umbrarum*. Ensuite nous avons entrepris une étude comparée du champignon cultivé avec ou sans bactéries. Ce travail a porté sur l'étude de la croissance des points de vue cinétique et pondéral, sur la morphogénèse des cultures et sur leurs caractères cytologiques. Enfin des confrontations ont été effectuées afin de mettre en évidence un éventuel antagonisme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Techniques de culture.

Les cultures contaminées dérivent toutes de la souche qui a servi dans notre premier travail : elle était issue d'une sporée de plusieurs apothécies apparues sur des fragments de bois en décomposition, mêlés à du terreau, dans une serre chaude. Les inoculum sont constitués par des fragments de cultures âgées de 2 à 12 mois, portant des apothécies mûres et des bactéries. Les ensemencements sont effectués en tube à essai de 25 x 200 mm contenant 20 ml de milieu incliné, à 1 % d'extrait de malt et 1,5 % d'agar-agar. Pour l'étude de l'antagonisme nous avons utilisé des boîtes de Pétri de 90 mm avec 30 ml de milieu.

L'obtention d'un mycélium pur présente quelques difficultés car il est nécessaire d'éliminer les bactéries sans altérer le champignon. Après avoir eu recours aux antibiotiques (pénicilline + streptomycine puis colistine) nous avons préféré réaliser une séparation mécanique en prélevant le front des cultures, mettant à profit le fait que le champignon s'accroît plus vite que les bactéries au début du développement, et ne les entraîne pas toujours. De nombreux prélèvements sont cependant nécessaires car le mycélium reste souvent contaminé. Quoiqu'il en soit cette méthode nous a permis de sélectionner plusieurs souches mycéliennes pures à l'abri des altérations que peuvent provoquer les antibiotiques.

L'isolement des bactéries est plus aisé. En effet, en milieu liquide, le développement du champignon est totalement inhibé par la colonie bactérienne. Initialement les premiers isolements avaient montré la présence d'un *Aeromonas* et d'un *Arthrobacter*. Ces souches se sont révélées inactives. Par contre un *Pseudomonas*, qui n'avait pas été identifié, a été isolé et identifié par P. KAISER de l'Institut National Agronomique de Paris. Ce *Pseudomonas* s'est révélé seul capable d'induire la reproduction sexuée du champignon de façon régulière. Les repiquages hebdomadaires pratiqués depuis plus de cinq années aboutissent toujours à des cultures fertiles. Ajoutons que la détermination de l'espèce du champignon reste délicate. Le genre *Scutellinia* qui comprend un assez grand nombre d'espèces de climats tempérés et chauds a fait l'objet de plusieurs contributions taxinomiques de LE GAL (1966, 1968, 1971) en vue d'une importante monographie à l'échelle mondiale restée inachevée*. Les publications existantes ont permis de rapporter le champignon isolé à l'espèce *S. umbrarum* (Fr.) Lambotte.

L'incubation des cultures est réalisée dans une pièce où la température reste voisine de 25°. La lumière est fournie par des tubes fluorescents Philips et la photopériode est de 9 heures.

2. Mesures de la croissance.

Croissance radiale : l'extension du mycélium à partir de l'inoculum situé à la base du milieu gélosé incliné est mesurée tous les jours jusqu'au recouvrement total. A chaque expérience 12 tubes sont ensemencés avec du mycélium pur et le même nombre par du mycélium contaminé. Ces essais ont été renouvelés dix fois. Les courbes représentent la longueur moyenne en millimètres d'une culture en fonction du temps.

Croissance pondérale : pour l'estimation de la croissance pondérale les cultures sont lavées plusieurs fois à l'eau chauffée au bain marie bouillant afin d'éliminer l'agar-agar. Le mycélium est pesé après séchage. Les courbes représentent le poids moyen en milligrammes de 12 cultures en fonction du temps. Ce traitement des cultures par l'eau chaude, entraînant les molécules hydrosolubles,

* Le décès de Mme LE GAL n'a malheureusement pas permis l'achèvement de cette mise au point.

ne permet pas d'atteindre un haut degré de précision dans la mesure de la masse mycélienne, il permet cependant d'effectuer des comparaisons.

3. Étude de l'antagonisme.

Champignon et bactérie sont repiqués à 50 mm l'un de l'autre dans des boîtes de Pétri de 90 mm. La croissance des colonies est suivie chaque jour. L'inhibition de la croissance s'évalue en pourcentage en appliquant la relation de VAN DEN HEUVEL comme l'ont fait AL-ALI & al. (1979).

$$I (\%) = \frac{R - r}{R} \times 100$$

où R est le rayon de la colonie fongique, dans une direction ne passant pas par la colonie bactérienne et r le rayon de la même colonie passant par la colonie bactérienne.

4. Techniques cytologiques.

Des fragments de culture sur gélose sont fixés pendant 5 h dans le glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,2 à la température ambiante. Après plusieurs lavages soigneux quelques fragments sont post-fixés par le tétr oxyde d'osmium à 1 % durant 2 h, rincés, déshydratés par l'éthanol et après trois bains d'oxyde de propylène inclus dans un mélange epon-araldite ou dans le milieu de SPURR (1969). Les coupes obtenues au microtome SERVALL sont contrastées par l'acétate d'uranylé en solution aqueuse saturée, à 40° pendant 1 h, puis par le citrate de plomb suivant VENABLE & COGGES-HALL (1965). Pour la mise en évidence des polysaccharides les coupes sont traitées suivant la méthode originale de THIÉRY (1967). Elles sont ensuite observées avec un microscope électronique SIEMENS ELMISKOP I.

Pour la microscopie optique les autres fragments, fixés seulement par le glutaraldéhyde et rincés, servent à la confection de coupes à main levée que l'on dépose sur des lames de verre. Après séchage à l'air ambiant, ces coupes peuvent être traitées par la plupart des colorants. Elles donnent une image de la texture des cultures plus fidèle que celle obtenue avec des coupes à la paraffine, tout en permettant l'étude fine des constituants cellulaires. L'inclusion à la paraffine a cependant été utilisée pour l'étude des apothécies. La coloration au «nuclear fast red»/bleu alcian de BENES & KAMINEK (1973) met bien en évidence l'ARN, les noyaux et les corps de Woronin. Le bleu de toluidine à pH 6,5, en donnant une bonne coloration d'ensemble, permet d'estimer le développement mycélien des cultures. Pour localiser les lipides nous avons employé le noir Soudan dans l'alcool à 60° à saturation, ainsi que le tétr oxyde d'osmium à 1 %. Le montage est effectué dans le sirop d'Apathy qui évite la déshydratation. La gomme iodée (LANGERON, 1949) révèle le glycogène par sa coloration brun acajou. Le bleu de toluidine à pH 4,4 suivi d'un rinçage dans HCl 0,1 N met en évidence les polyphosphates par leur métachromasie (WIAME, 1949). L'amido-black 10 B (FISHER, 1968) colore spécifiquement les protéines. Des digestions

enzymatiques de contrôle sont effectuées par la pronase Calbiochem en solution à 0,2 % dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, à 37°, ou par la pepsine Fluka, trois fois cristallisée, en solution à 0,2 % dans HCl 0,1 N, à 37°, pendant 3 h. Les pigments caroténoïdes sont recherchés sur le matériel vivant sans coloration, et après action de la solution iodo-iodurée ou de l'acide sulfurique concentré. Nous utilisons également le procédé d'extraction préconisé par ARPIN (1968).

RÉSULTATS

1 - Étude de la croissance mycélienne.

La croissance radiale (Fig. 1) est mesurée à partir du 4^{ème} jour : les colonies du mycélium pur (courbe en trait plein) ont alors 18 mm et celles du mycélium contaminé (courbe en tirets) 23 mm. Les 100 mm (recouvrement total du milieu) sont atteints vers le 13^{ème} jour par le mycélium contaminé tandis qu'il

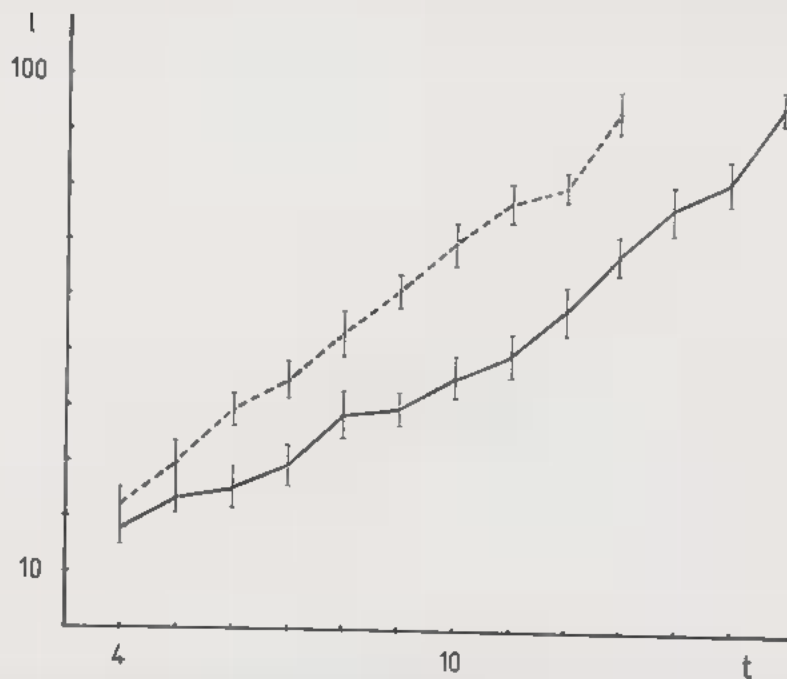


Fig. 1. — Progression du front du mycélium du *Scutellinia*. l : longueur d'une culture en millimètres, t : temps en jours. Chaque point représente la valeur moyenne de 30 mesures; chaque barre verticale correspond à l'écart-type. Courbe en trait plein : mycélium pur. Courbe en tirets : mycélium contaminé.

Fig. 1. — Progression of the front of the mycelium of *Scutellinia*. l : length of a culture in mm, t : time in days. Each point is the average of 30 data; the bars indicate the standard deviation. Solid line : pure mycelium. Dashed line : contaminated mycelium.

faut plus de 16 jours au mycélium pur pour y parvenir. Le calcul de l'écart-réduit ϵ entre les deux points d'un même jour montre que la différence entre ces deux moyennes est toujours significative (écart-réduit $\epsilon > 1,96$) même pour le 4ème jour ($\epsilon = 5,57$) et le 5ème jour ($\epsilon = 7,62$) où les variations des deux moyennes se recouvrent.

Les vitesses de croissance des fronts mycéliens calculées entre les 4ème et 13ème jour et exprimées en mm jour^{-1} , sont pour le mycélium pur : 5,47 - 1,53 - 4,5 - 9,07 - 1,2 - 5,63 - 4,5 - 8,1 - 10,57 et pour le mycélium contaminé : 7,53 - 9,64 - 5,4 - 8,7 - 7,93 - 8,3 - 7,13 - 2,91 - 14,83. Mis à part les 7ème et 11ème jour, la vitesse de croissance du mycélium contaminé est toujours supérieure à celle du mycélium pur. Les moyennes des deux séries sont respectivement 5,61 et 8,04. Ces chiffres montrent que la croissance radiale est stimulée par la colonie bactérienne. Si l'on se réfère à l'échelle établie par BERTHET (1964) qui a cultivé de nombreux *Discomycètes*, la vitesse de croissance du mycélium du

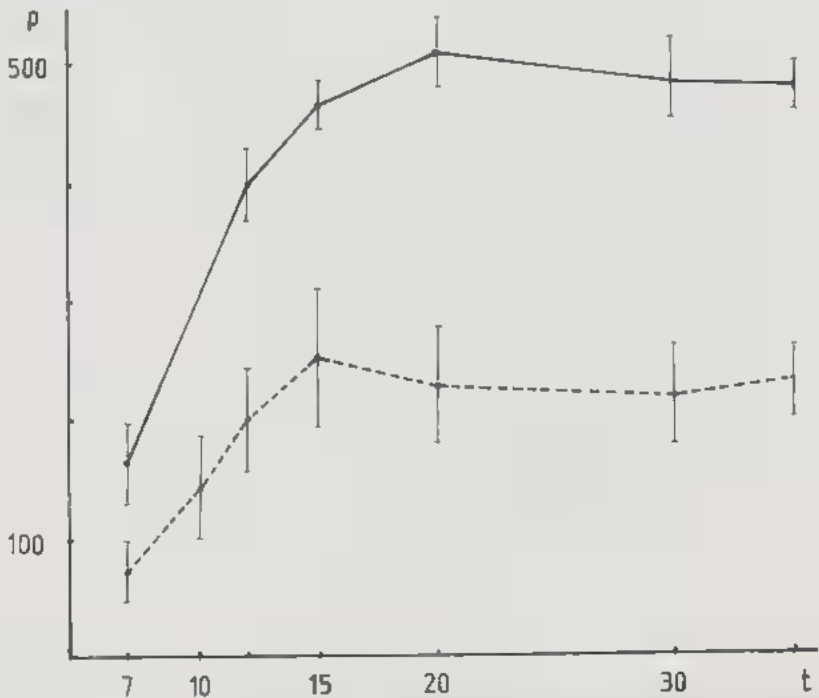


Fig. 2. — Croissance pondérale du mycélium du *Scutellinia*. p : poids en milligrammes de 12 cultures, t : temps en jours. Chaque point représente la valeur moyenne de 6 mesures; chaque barre verticale correspond à l'écart-type. Courbe en trait plein : mycélium pur. Courbe en tirets : mycélium contaminé.

Fig. 2. — Ponderal growth of the mycelium of *Scutellinia*. p : weight of 12 cultures in mg, t : time in days. Each point is the average of 6 data; the bars indicate the standard deviation. Solid line : pure mycelium. Dashed line : contaminated mycelium.

Scutellinia est rapide lorsqu'il est pur et très rapide lorsqu'il est en présence du *Pseudomonas*.

Les courbes de la croissance pondérale (Fig. 2) ont été établies entre le 7ème et le 35ème jour qui correspond à l'apparition des apothécies dans les cultures contaminées. Ces courbes ont des profils comparables et il apparaît manifestement qu'à tout moment la masse de matière produite par les cultures contaminées (courbe en tirets) est très nettement inférieure à celle que produisent les cultures pures (courbe en trait plein). Ici, comme le nombre des mesures est petit (6 à 8), le test de comparaison n'est plus fondé sur la valeur de l'écart-réduit ϵ mais sur la valeur de t . Ces calculs montrent que pour tous les points, la différence des moyennes est significative à mieux que 1‰.

La colonie bactérienne inhiberait donc la croissance mycélienne du point de vue pondéral alors qu'elle stimulerait la vitesse de croissance du front mycélien.

2 - Étude macroscopique des cultures.

A partir de l'inoculum, situé à la base du tube, le mycélium et la colonie bactérienne s'accroissent en même temps jusqu'au quatrième jour. Ensuite le mycélium émerge de la colonie bactérienne.

Le mycélium pur prend très tôt une coloration orangée. En même temps se développe une zonation formée par une alternance de bandes claires et de bandes fortement colorées disposées sur des arcs de cercles concentriques ayant pour centre l'inoculum. Cette zonation débute près du front de la culture et s'étend ensuite jusque vers l'inoculum (Pl. I-1). La plupart des cultures pures n'évoluent plus, elles conservent cet aspect jusqu'au dessèchement. Cependant celles issues du premier repiquage, c'est-à-dire celles dont l'inoculum est constitué par des hyphes prélevées dans le front d'une culture contaminée, perdent pigmentation et zonation après 2 ou 3 mois et produisent des apothécies dépourvues d'asques (cf. infra).

Chez le mycélium contaminé la pigmentation est limitée aux parties frontales où la colonie bactérienne n'est pas apparente. Comme dans le cas du mycélium pur elle s'accompagne d'une zonation qui ne comporte pas plus de 3 à 5 bandes. Vers le 35ème jour de culture, parfois avant, des ébauches d'apothécies apparaissent à la surface de la culture, dans la zone claire, c'est-à-dire là où la colonie bactérienne est bien développée (Pl. I-2). Par la suite, après 2 ou même 3 mois de culture, la pigmentation et la zonation qui affectaient la zone frontale, disparaissent en même temps que naissent des apothécies (Pl. I-3).

Afin de déterminer les causes de la zonation certaines cultures ont été soumises à un éclairage continu à température constante, d'autres à l'obscurité totale mais avec les mêmes variations de température qu'entraînent le fonctionnement et l'arrêt des tubes fluorescents. Dans la première expérience la zonation est totalement absente des cultures qui sont cependant orangées, dans la seconde la zonation est présente mais non la pigmentation. Nous n'avons pu mesurer l'effet des alternances lumière/obscurité à température constante. Néanmoins il est évident qu'il s'agit là d'un cas banal de rythme exogène puisque les zona-

tions disparaissent lorsque les variations de température cessent. La croissance mycélienne est différente pour deux températures données (JEREBZOFF, 1961). Quant à la pigmentation, étant due à des caroténoïdes (cf. infra) elle est sous le contrôle de la lumière comme cela est le cas chez beaucoup de Champignons (RAU, 1976).

3. Étude de l'antagonisme.

Le champignon et la bactérie sont mis en présence dans des boîtes de Pétri de 90 mm en disposant les inoculum à 50 mm l'un de l'autre. Le mycélium s'étend beaucoup plus vite que la colonie bactérienne. Le rayon de la colonie fongique reste constant dans toutes les directions, même dans celle de la colonie bactérienne. Le taux d'inhibition est donc nul. Le champignon pénètre ensuite dans la colonie bactérienne. A partir de ce stade on constate que celle-ci s'accroît plus dans la direction de l'inoculum fongique que dans les autres. Ceci montre que les bactéries ne sont pas entraînées passivement par les hyphes en croissance, elles remontent vers les articles plus âgés, plus riches en réserves. La traversée de la colonie bactérienne provoque un faible retard dans la croissance mycélienne. Évalué en taux d'inhibition (formule de VAN DEN HEUVEL) il atteint 4,6 %. Au bout de 10 jours le champignon couvre toute la surface de la boîte de Pétri. Vers le 15ème jour toute la surface de la culture est recouverte par la colonie bactérienne. Après 2 mois de nombreuses apothécies apparaissent au niveau de l'inoculum bactérien (Pl. I-4).

On peut conclure de ces confrontations que la bactérie n'inhibe pas le champignon à distance et que la moindre croissance du champignon au niveau de la colonie bactérienne résulte soit de l'affrontement physique des deux organismes et d'une compétition pour la nutrition, soit de la production de substances antibiotiques non diffusibles dans le milieu. Enfin il est important de noter que la bactérie trouve dans la colonie fongique un milieu particulièrement favorable puisqu'elle remonte vers la base des hyphes et que finalement son développement est manifestement supérieur à celui qu'elle atteint lorsqu'elle est cultivée seule.

4. Étude microscopique des cultures, caractères cytologiques des hyphes, évolution.

Les coupes verticales radiales des cultures de 7 jours pures et contaminées montrent que le mycélium se développe à la surface et dans le substrat. Le mycélium aérien est totalement absent (Pl. II-5).

La zonation, bien apparente dans les cultures pures, est due à une alternance de bandes dans lesquelles les hyphes sont très denses, car très ramifiées, avec des bandes où les hyphes le sont moins (Pl. II-6).

La présence du *Pseudomonas* n'affecte pas la structure cytologique des hyphes jusque vers le 20ème jour. Les articles contiennent de nombreux globules lipidiques et d'importantes plages de glycogène (Pl. VI-16). Il s'en suit que le hyaloplasme est réduit à de fines travées (Pl. III-7) contenant peu de ribosomes

(Pl. VI-17). Les vacuoles qui restent de petite taille (1 μm) contiennent un dépôt très dense après l'acétate d'uranyle (polyphosphates) (Pl. VII-18) et une fine granulation après le protéinate d'argent (polysaccharides) (Pl. VII-20). La présence de polyphosphates dans les dépôts vacuolaires est confirmée par la méta-chromasie avec le bleu de toluidine à pH 1 (Pl. III-10). Tous les articles (Pl. III-7) ont la particularité de contenir une vingtaine de corps sphériques très chromophiles présentant les mêmes caractères que les corps de Woronin qui accompagnent les pores septaux : nature protéique (digestion par la pronase et la pepsine, coloration par l'amidoblack) structure fine identique (contenu dense, simple membrane limitante) (Pl. VII-18, 19).

Les différences apparaissent après la 3ème semaine :

– dans les cultures pures les hyphes superficielles régressent, les hyphes profondes deviennent très denses et leurs réserves augmentent. Il s'en suit que le cytoplasme se trouve concentré dans la partie centrale sous la forme d'un gros et long tractus contenant les noyaux, les granules métachromatiques et les corps protéiques (Pl. III-9).

– dans le mycélium contaminé par contre, les réserves n'augmentent pas. Certains articles se vident et meurent. Des chlamydo-spores apparaissent. Les bactéries fixées sur les parois des hyphes superficielles sont très nombreuses (Pl. III-8).

Par la suite ces phénomènes de nécrose dans les cultures contaminées vont s'accroître. L'examen de coupes pratiquées dans une culture contaminée (Pl. IV-11) et dans une culture pure (Pl. IV-12) du même âge (1 mois) traitées par le tétraxyde d'osmium qui met en évidence les lipides insaturés, montre que les hyphes sont beaucoup plus denses dans la culture pure et, qu'en outre, de nombreuses hyphes sont vides dans la culture contaminée. A ce stade les bactéries sont nombreuses dans le voisinage des parois fongiques, elles sont liées aux fibrilles de la strate externe (Pl. VIII-21). Leur présence à l'intérieur des hyphes n'a été observée que dans les hyphes presque vides à paroi très amincie (Pl. VIII-22). C'est à ce moment que se forment les ascogones et les chlamydo-spores que nous avons déjà décrits (SCHRANTZ, 1980).

De tels phénomènes ne se produisent pas dans les cultures pures. La plupart d'entre elles restent stériles, seules celles issues d'un premier repiquage, c'est-à-dire celles dont l'inoculum est constitué par des hyphes prélevées dans le front d'une jeune culture contaminée, produisent des chlamydo-spores et des apothécies stériles. Ces fructifications sont morphologiquement normales, bien que de taille plus petite, mais leur hyménium ne contient que des paraphyses, les asques font toujours défaut (Pl. V-13). Leur développement débute de la même manière que celui des apothécies normales. Les ascogones bourgeonnent des boyaux d'où naissent quelques hyphes ascogènes (Pl. V-15) mais celles-ci n'évoluent pas et dégèrent, si bien que dans les apothécies adultes on ne trouve aucune trace du sous-hyménium générateur d'asques qui existe dans les apothécies normales (Pl. V-14).

Cette production d'apothécies stériles par du mycélium pur, de même que la production d'apothécies normales par du mycélium contaminé, s'accompagnent

toujours de la disparition de la coloration orangée des cultures au profit des apothécies. Bien que la pigmentation des hyphes végétatives ne présente pas les réactions cytochimiques habituelles des caroténoïdes (coloration bleu intense avec l'acide sulfurique, coloration verte avec une solution iodo-iodurée) sa nature caroténoïdique ne fait aucun doute puisqu'après extraction par l'acétone, addition d'eau puis d'éther de pétrole, elle se révèle totalement épiphasique (AR-PIN, 1968). On peut penser que les pigments des hyphes végétatives migrent dans les apothécies. Mais néanmoins il est probable que des modifications chimiques ou physico-chimiques se produisent à ce moment car les pigments des apothécies présentent les réactions classiques des caroténoïdes. En outre un rôle des caroténoïdes dans la reproduction sexuée pourrait être envisagé, nous en discuterons dans les conclusions.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'examen des courbes de croissance montre clairement que la croissance radiale est stimulée par la colonie bactérienne dans la phase initiale, lors du recouvrement de la surface du milieu. Par contre, la croissance pondérale est relativement inhibée puisque la masse de matière produite par les cultures contaminées est toujours sensiblement égale à la moitié de celle produite par les cultures pures.

Du point de vue macroscopique la présence de *Pseudomonas* entraîne la disparition de la zonation et de la pigmentation par les caroténoïdes qui se développent dans les cultures pures. Il permet la production de chlamydospores et d'apothécies fertiles (avec asques contenant des ascospores capables de germer) alors que la plupart des cultures pures restent stériles. Cependant lorsqu'il vient d'être séparé de la bactérie le mycélium pur est capable de produire des apothécies stériles (dépourvues d'asques).

Au point de vue cytologique on constate que les bactéries sont fixées aux fibrilles externes des parois fongiques. Elles ne pénètrent pas dans les hyphes vivantes, mais seulement dans les hyphes mortes. Le *Pseudomonas* paraît donc être un épiphyte du *Scutellinia*. Il entraîne la diminution des réserves des articles contaminés et la mort d'un nombre important d'entre eux alors que le mycélium pur accumule les réserves (lipides, glycogène). Ces observations montrent clairement que le *Pseudomonas* induit les reproductions sexuée et asexuée du *Scutellinia*, elles ne permettent pas néanmoins de connaître le mode d'action de cette bactérie. On ne peut pas en effet savoir si la diminution des réserves et la destruction partielle des hyphes sont les causes réelles du déclenchement des phénomènes de la reproduction ou seulement les conséquences, la bactérie provoquant une modification plus intime du métabolisme fongique. Dans cet ordre d'idée, la production d'apothécies stériles par du mycélium pur normalement développé peut faire penser que le déclenchement des phénomènes de reproduction n'est pas dû à la réduction du mycélium végétatif.

On peut aussi se demander pour quelles raisons les pigments caroténoïdes disparaissent du mycélium végétatif lorsque naissent les apothécies. Ils ont souvent été considérés comme des photorécepteurs chez les champignons dont la reproduction sexuée est photo-dépendante (CARLILE, 1970; LEACH, 1971). Plus récemment MOORE-LANDECKER (1981) qui a étudié l'action de la lumière sur le *Pyronema domesticum* ne voit aucune raison pour attribuer un tel rôle aux caroténoïdes. D'ailleurs actuellement d'autres substances telles les mycosporines sont considérées comme photorécepteurs dans le cas de certaines espèces (ARPIN & BOUILLANT, 1981). Selon HSIAO & MOLLER (1984) qui ont localisé des caroténoïdes sur les membranes mitochondriales du *Verticillium agaricinum*, ces pigments pourraient, en changeant les propriétés de ces membranes, modifier la respiration. Lorsque l'on sait qu'une stimulation du métabolisme oxydatif favorise la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (VIALA & VIDAL, 1972) on peut envisager comme possible un rôle inhibiteur des caroténoïdes dans la reproduction du *Scutellinia* dans la mesure où une partie d'entre eux seraient liés aux mitochondries.

Du point de vue de la morphogenèse des apothécies ces observations sont intéressantes. Elles montrent que le système haploïde gamétophytique stérile (hyphes de la chair et paraphyses nées du pied de l'ascogone) est indépendant du système sporophytique dicaryotique issu de l'ascogone fécondé. En effet des apothécies stériles, mais macroscopiquement normales, peuvent s'édifier alors que le système ascogène ne se développe pas. Généralement l'initiation des deux systèmes est conditionnée par la formation et l'évolution des ascogones. On sait que chez de nombreux Discomycètes il y a apogamie (CHADEFAUD, 1960), les ascogones ne sont pas fécondés mais se comportent comme s'il l'avaient été et engendrent un appareil sporophytique dicaryotique. Nous n'avons pas étudié les phénomènes nucléaires dans les ascogones du *Scutellinia* mais la dégénérescence des hyphes ascogènes dans les apothécies stériles laisse penser que le déroulement normal des processus nucléaires est bloqué lors de l'appariement des noyaux complémentaires, bien avant la formation du crochet. La présence de la colonie bactérienne se révèle alors indispensable pour l'accomplissement de ces phénomènes. Finalement on peut considérer le *Pseudomonas* comme un antagoniste du *Scutellinia* comparable à certains champignons inducteurs d'organes sexués chez l'*Helminthosporium teres* étudiés par AL-ALI & al. (loc. cit.).

Nos observations ne permettent pas de savoir quelle est la véritable action du *Pseudomonas* sur le champignon puisque les métabolites bactériens n'ont pas été recherchés. Dans ce domaine les résultats sont fragmentaires et parfois contradictoires. Selon HAYES & al. (1969) le *Pseudomonas putida* favoriserait la fructification de l'*Agaricus bisporus* en permettant la capture des ions métalliques toxiques présents dans le milieu. Plus tard, WOOD (1976) n'a pas confirmé cette stimulation. Pour d'autres auteurs l'*Agaricus bisporus* utiliserait préférentiellement des polysaccharides bactériens (STANEK, 1972; EDDY & JACOBS, 1976). Le *Gaeumannomyces graminis* pousse mieux en présence de polysaccharides bactériens (LASIK & al., 1979).

Quoi qu'il en soit il est bon de rappeler que de nombreuses espèces du genre *Pseudomonas*, qui colonisent facilement les racines sont considérées comme bénéfiques pour les plantes (plant growth-promoting rhizobacteria de SCHROTH & HANCOCK, 1982). Cette action n'a pas reçu d'explication. Les *Pseudomonas* produiraient un grand nombre de métabolites secondaires, d'acides aminés rares et de peptides dont le rôle n'est pas connu. C'est en identifiant ces substances que l'on pourra mieux comprendre la nature de ces interactions entre les microorganismes du sol.

BIBLIOGRAPHIE

- AL-ALI B., BARRAULT G. et ALBERTINI L., 1979 — Action *in vitro* d'antagonistes fongiques et bactériens sur la croissance mycélienne de l'*Helminthosporium teres* Sacc. parasite de l'Orge. *Bull. Soc. Mycol. France* 95 : 279-295.
- ARPIN N., 1968 — Recherches chimiotaxinomiques sur les champignons. XI. Nature et distribution des caroténoïdes chez les Discomycètes operculés (*Sarcoscyphaceae* exclues); conséquences taxinomiques. *Bull. Soc. Mycol. France* 83 : 427-474.
- ARPIN N. and BOUILLANT M.L., 1981 — Light and mycosporines. In : TURIAN & HOHL, *The fungal spore : morphogenetic controls*. Academic Press : 435-454.
- ASTHANA R.P. and HAWKER L.E., 1936 — The influence of certain fungi on the sporulation of *Melanospora destruens* Shear, and of some other Ascomycetes. *Ann. Bot. (London)* 50 : 325-344.
- BENES K. and KAMINEK M., 1973 — The use of nuclear Fast Red in Plant material successively with Alcian Blue. *Biol. Pl.* 15 : 294-297.
- BERTHET P., 1964 — Essai biotaxinomique sur les Discomycètes. Thèse Doct. d'État, Lyon.
- BRUMMELEN J. van, 1967 — A world-monograph of the genera *Ascobolus* and *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales). *Persoonia*, suppl. vol. 1 : 1-253.
- CARLILE M.J., 1970 — The photoresponses of fungi. In : J. WILEY, *Photobiology of microorganisms*. New York, Per Halldal : 309-344.
- CHADEFAUD M., 1960 — Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie). In : M. CHADEFAUD & L. EMBERGER, *Traité de Botanique systématique*. Paris, Masson, 1, 1018 p.
- EDDY B.P. and JACOBS L., 1976 — Mushroom compost a nutrient source for *Agaricus bisporus*. *Mushroom J.* 38 : 56.
- FISHER D.B., 1968 — Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16 : 92-96.
- HAYES W.A., RANDLE P.E. and LAST F.T., 1969 — The nature of the microbial stimulus affecting sporophore formation in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Ann. Appl. Biol.* 64 : 177-187.
- HSIAO K.C. and MOLLER I.M., 1984 — The subcellular distribution of carotenoids in light-grown *Verticillium agaricinum*. *Physiol. Pl.* 62 : 167-174.
- JEREBZOFF S., 1961 — Étude de phénomènes périodiques provoqués par des facteurs physiques et chimiques chez quelques champignons. Thèse Doct. d'État, Toulouse.
- LANGERON M., 1949 — *Précis de microscopie*. Paris, Masson, 1430 p.

- LASIK J., STANEK M., VANCURA V. and WURST M., 1979 – Effect of bacterial polysaccharides on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and wheat roots. *Folia Microbiol. (Prague)* 24 : 262-268.
- LEACH C.M., 1971 – A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In : C. BOOTH, *Methods in microbiology*. New York, Academic Press : 609-664.
- LE GAL M., 1966 – Contribution à la connaissance du genre *Scutellinia* (Cooke) Lamb. *emend.* LE GAL (1ère étude). *Bull. Soc. Mycol. France* 82 : 301-334.
- LE GAL M., 1968 – Contribution à la connaissance du genre *Scutellinia* (Cooke) Lamb. *emend.* LE GAL (2ème étude). *Bull. Soc. Mycol. France* 84 : 375-380.
- LE GAL M., 1971 – Contribution à la connaissance du genre *Scutellinia* (Cooke) Lamb. *emend.* LE GAL (3ème étude). *Bull. Soc. Mycol. France* 87 : 433-440.
- MCCORMICK F.A., 1925 – Perithecia of *Thielavia basicola* Zopf. in culture and the stimulation of their production by extracts from other fungi. *Bull. Connecticut Agric. Exp. Sta.* 269 : 539-554.
- MOLLIARD M., 1903 – Rôle des bactéries dans la production des périthèces des *Ascobolus*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 136 : 899-901.
- MOORE-LANDECKER E., 1981 – Histochemical observations on apothecia, permanently vegetative hyphae, and sclerotia of *Pyronema domesticum* with special reference to light. *Canad. J. Bot.* 59 : 1726-1737.
- PARK J.Y. and AGNIHORTI V.P., 1969 – Sporophore production of *Agaricus bisporus* in aseptic environments. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 35 : 523-528.
- RAU N., 1976 – Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Pure Appl. Chem.* 47 : 237-243.
- SARTORY A., 1916 – De l'influence d'une bactérie sur la production des périthèces chez un *Aspergillus*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Mém. Soc. Biol.* 79 : 174-175.
- SARTORY A., 1918 – Sporulation par symbiose chez des champignons inférieurs. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 167 : 302-305.
- SCHRANTZ J.P., 1980 – Fructification d'un *Scutellinia* (Discomycète) en culture *in vitro*, en présence de bactéries. *Cryptogamie, Mycol.* 1 : 241-250.
- SCHROTH M.N. and HANCOCK J.G., 1982 – Disease suppressive soil and rootcolonizing bacteria. *Science* 216 : 1376-1381.
- SPURR A.R., 1969 – A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26 : 31-43.
- STANEK M., 1972 – Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. *Mushroom Science* 8 : 797.
- THIERY J.P., 1967 – Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6 : 987-1018.
- VENABLE J.H. and COGGESHALL R., 1965 – A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25 : 407-408.
- VIALA G. and VIDAL G., 1972 – Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le *Leptosphaeria typhae*. *Physiol. Vég.* 10 : 481-494.
- WIAME J.M., 1949 – The occurrence and physiological behaviour of two metaphosphate fractions in yeast. *J. Biol. Chem.* 178 : 919-924.
- WILSON E.E., 1927 – Effects of fungus extracts upon the initiation and growth of perithecia of *Venturia inaequalis* in pure culture. *Phytopathology* 17 : 835-836.
- WOOD D.A., 1976 – Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *J. Gen. Microbiol.* 95 : 313-323.

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I - Macrophotos de cultures.

- 1 - Culture de mycélium pur âgée de 45 jours. La zonation est apparente sur toute la surface.
- 2 - Culture de mycélium contaminé par *Pseudomonas* âgée de 45 jours. La zonation est légèrement perceptible dans la partie frontale. Des apothécies sont présentes au niveau de la colonie bactérienne où la zonation est absente.
- 3 - Culture de mycélium contaminé par *Pseudomonas* âgée de 60 jours. La zonation a complètement disparu. Des apothécies sont présentes sur toute la surface.
- 4 - Confrontation entre le mycélium pur (à gauche) et le *Pseudomonas* (à droite). De nombreuses apothécies se sont formées au niveau de la colonie bactérienne.

Plate I - Macrophotos of cultures.

- 1 - Culture of pure mycelium 45 days old. Zonation appears on the whole surface.
- 2 - Culture of mycelium contaminated by *Pseudomonas* 45 days old. Zonation is perceptible only in front. Apothecia are present on level with the bacterial colony where zonation is absent.
- 3 - Culture of mycelium contaminated only by *Pseudomonas* 60 days old. Zonation have entirely disappeared. Apothecia are present on the whole surface.
- 4 - Confrontation between the pure mycelium (on the left) and *Pseudomonas* (on the right). Numerous apothecia are formed on level with the bacterial colony.

Planche II - Micrographies optiques.

- 5 - Coupe radiale d'une culture de mycélium contaminé âgée de 15 jours. Les hyphes se développent à la surface, mais surtout dans le substrat. Le mycélium aérien est absent. Bleu de toluidine pH 6,5.
- 6 - Coupe radiale d'une culture zonée de mycélium pur âgée de 15 jours, montrant les hyphes densément ramifiées à gauche, peu ramifiées au centre. Bleu de toluidine pH 6,5.

Plate II - Optic micrographies.

- 5 - Radial section through a culture of contaminated mycelium 15 days old. Hyphae are growing to the surface but principally inside the medium. Aerial hyphae fail. Toluidine blue pH 6,5.
- 6 - Radial section through a zonate culture of pure mycelium 15 days old, showing densely branched mycelia on the left and less-branched hyphae in the middle. Toluidine blue pH 6,5.

Planche III - Micrographies optiques.

- 7 - Hyphes d'une culture contaminée montrant les fines travées cytoplasmiques, les noyaux (N) et les corps de Woronin (W) libres ou contre les septums. Les lipides et le glycogène ne sont pas conservés. Bleu alcian/nuclear fast red.
- 8 - Hyphes d'une culture contaminée âgée de 30 jours. Les bactéries sont très abondantes contre les parois du champignon. Noir Soudan.
- 9 - Hyphe d'une culture pure âgée de 30 jours. Le cytoplasme est concentré au centre de la cellule. Bleu alcian/nuclear fast red.
- 10 - Mise en évidence des granules métachromatiques (polyphosphates) dans une hyphe d'une culture pure. Bleu de toluidine pH 4,4 + HCl 0,1 M.

Plate III — Optic micrographies.

- 7 — Hyphae of a contaminated culture showing fine cytoplasmic bays, nuclei (N) and Woronin bodies (W) along the septum (some are free in the cytoplasm). Lipids and glycogen are not preserved. Alcian blue/nuclear fast red.
- 8 — Hyphae of a contaminated culture 30 days old. Bacteria are very numerous on hyphal walls.
- 9 — Hypha of a pure culture 30 days old. Cytoplasm is concentrated in the centre of the cell. Alcian blue/ nuclear fast red.
- 10 — Hypha of a pure culture stained for metachromatic granules (polyphosphate). Toluidine blue pH 4,4 + HCl 0,1 M.

Planche IV — Micrographies optiques.

- 11 — Coupe radiale dans une culture de mycélium contaminé, âgée de 30 jours. Les hyphes vides sont nombreuses. OsO₄ + bleu alcian.
- 12 — Coupe radiale dans une culture de mycélium pur âgée de 30 jours. Les hyphes vivantes sont très denses. OsO₄ + bleu alcian.

Plate IV — Optic micrographies.

- 11 — Radial section through a culture of contaminated mycelium, 30 days old. Empty hyphae are numerous. OsO₄ + alcian blue.
- 12 — Radial section through a culture of pure mycelium, 30 days old. Living hyphae are very dense. OsO₄ + alcian blue.

Planche V — Micrographies optiques.

- 13 — Coupe longitudinale dans une apothécie stérile produite par une culture pure. L'hyménium ne contient que des paraphyses. Bleu alcian / nuclear fast red.
- 14 — Coupe longitudinale dans une apothécie fertile produite par une culture contaminée. L'hyménium contient des paraphyses et des asques octosporés. Bleu alcian/ nuclear fast red.
- 15 — Coupe longitudinale dans une très jeune apothécie produite par une culture pure et montrant les cellules ascogoniales (As) et les hyphes ascogènes (Ha). Bleu alcian/ nuclear fast red.

Plate V — Optic micrographies.

- 13 — Longitudinal section of a sterile apothecium produced by a pure culture. Hymenium includes only paraphyses. Alcian blue/ nuclear fast red.
- 14 — Longitudinal section of a fertile apothecium produced by a contaminated culture. Hymenium includes paraphyses and octosporous asci. Alcian blue / nuclear fast red.
- 15 — Longitudinal section of a very young apothecium produced by a pure culture and showing cells of ascogonium (As) and ascogenous hyphae (Ha). Alcian blue/ nuclear fast red.

Planche VI — Micrographies électroniques.

- 16 — Coupe d'une hyphe d'une culture pure âgée de 9 jours. Les globules lipidiques (L) et le glycogène (G) sont abondants. Technique de Thiéry.
- 17 — Hyphe semblable mais contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Les ribosomes (R) sont rares. Le glycogène est dissous.

Plate VI – Electronic micrographies.

16 – Section of a hypha of a pure culture 9 days old. Lipid globules (L) and glycogenic granules (G) are numerous. Technique of Thiéry.

17 – Similar hypha but contrasted with uranyl acetate and with lead citrate. Ribosomes (R) are scarce. Glycogen is dissolved.

Planche VII – Micrographies électroniques.

18 – Coupe dans une hyphe d'une culture pure âgée de 30 jours, contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Les vacuoles contiennent une grosse inclusion opaque aux électrons (P). Un corps de Woronin libre (W), semblable à ceux des septums, est présent.

19 – Coupe au niveau d'un septum montrant la structure des corps de Woronin. Acétate d'uranyle et citrate de plomb.

20 – Coupe dans une hyphe d'une culture pure âgée de 20 jours (technique de Thiéry). Le contenu des vacuoles est marqué par le protéinate d'argent.

Plate VII – Electronic micrographies.

18 – Section of a hypha of a pure culture 30 days old, contrasted with uranyl acetate and with lead citrate. Vacuoles include a large electron-dense inclusion (P). A free Woronin body (W), similar to those of septae, is present.

19 – Section through a septum showing the structure of Woronin bodies. Uranyl acetate and lead citrate.

20 – Section of a hypha of a pure culture 20 days old (Technique of Thiéry). Reaction product is deposited over the inclusion of vacuoles.

Planche VIII – Micrographies électroniques.

21 – Coupe montrant la liaison des *Pseudomonas* à la paroi des hyphes. Acétate d'uranyle, citrate de plomb.

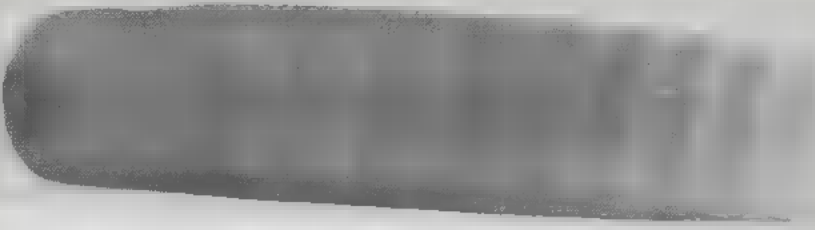
22 – Coupe montrant des bactéries à l'intérieur d'une hyphe morte, (P = paroi du champignon). Acétate d'uranyle, citrate de plomb.

Plate VIII – Electronic micrographies.

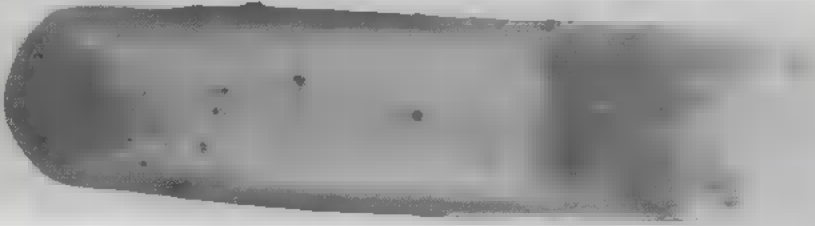
21 – Section showing *Pseudomonas* fixed at the wall of hyphae. Uranyl acetate, lead citrate.

22 – Section showing bacteria inside a dead hypha (P = hyphal wall). Uranyl acetate, lead citrate.

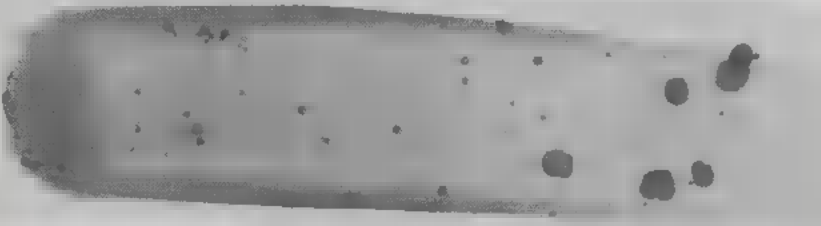
1



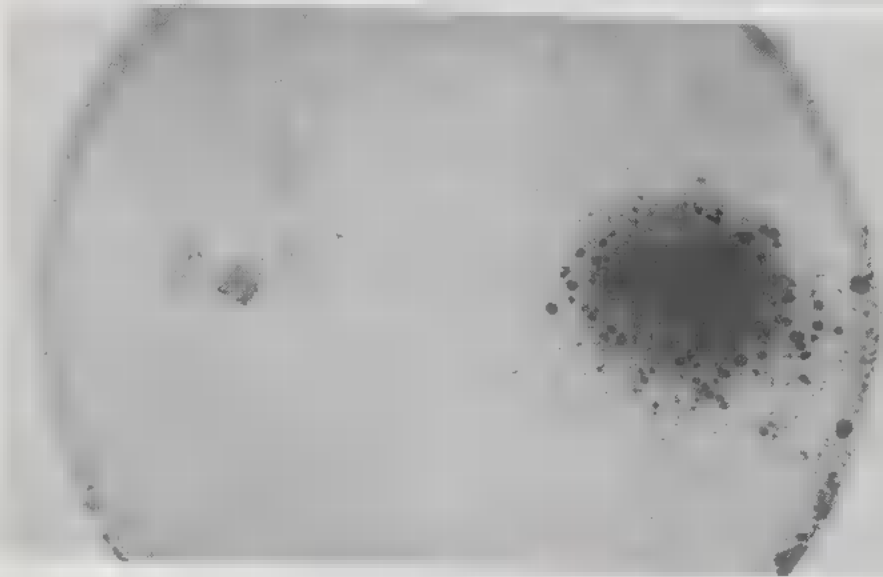
2



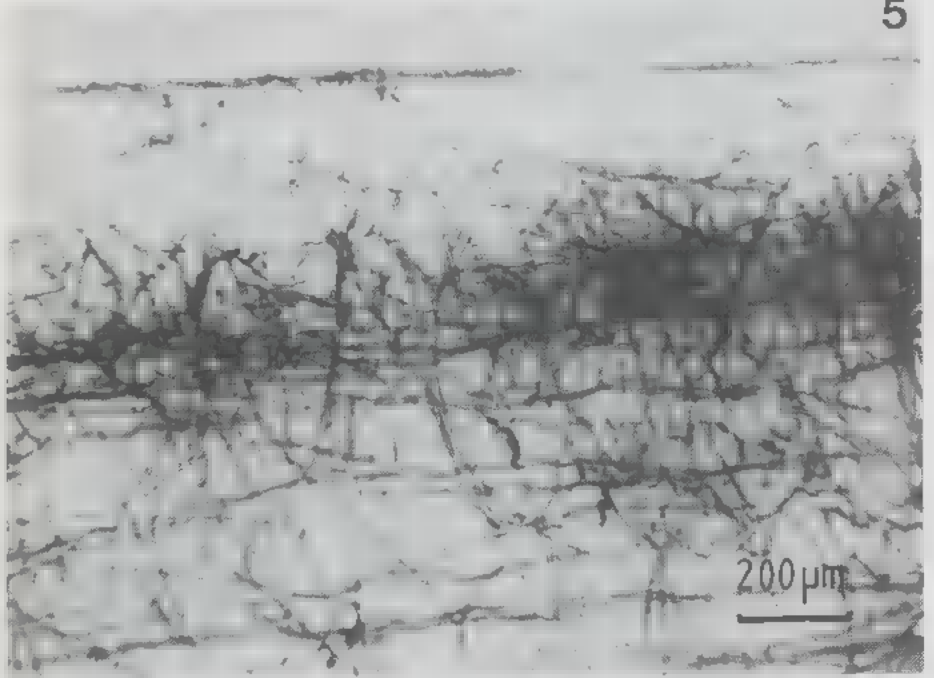
3



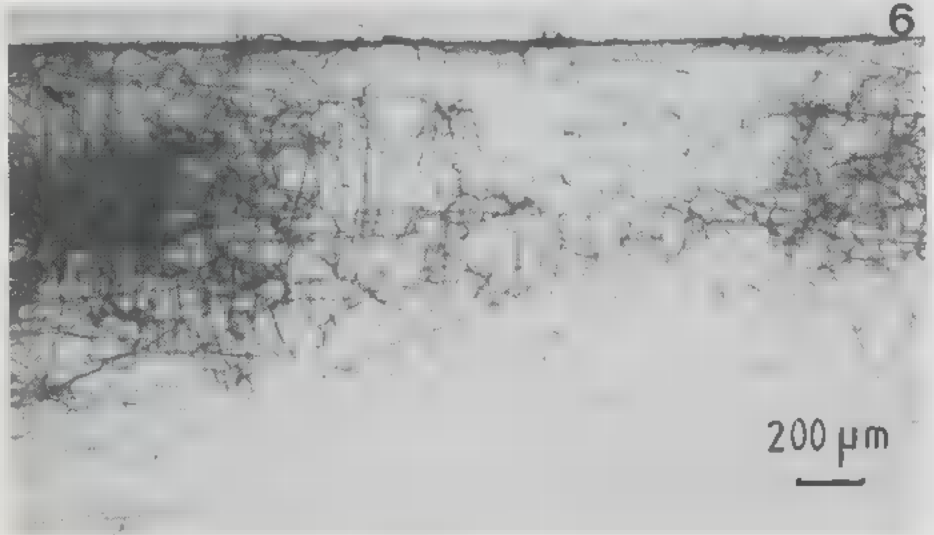
4

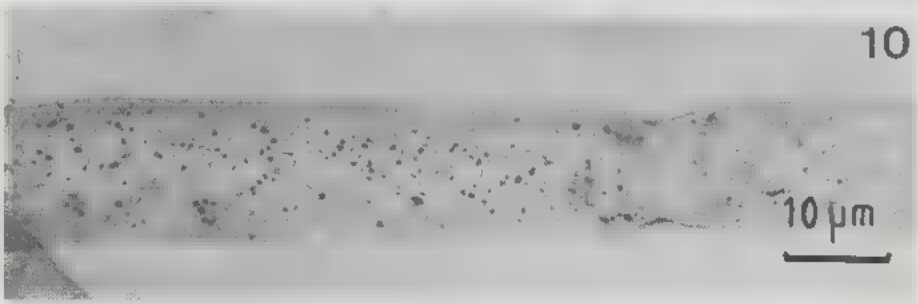
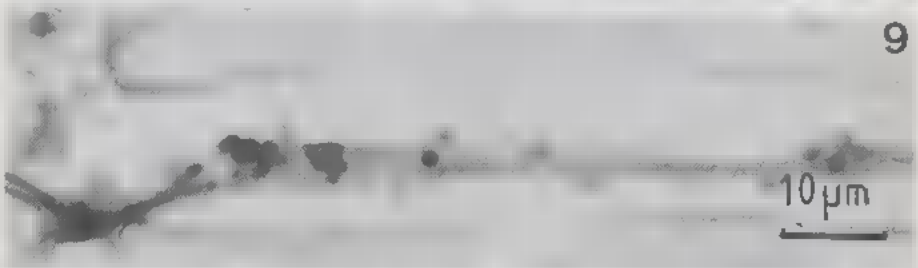
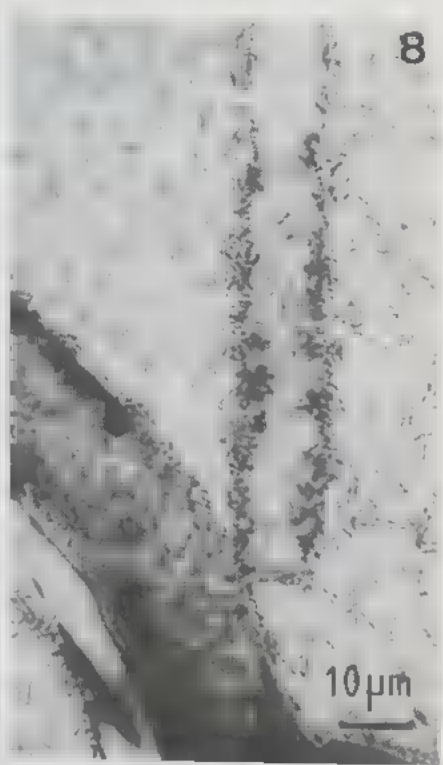
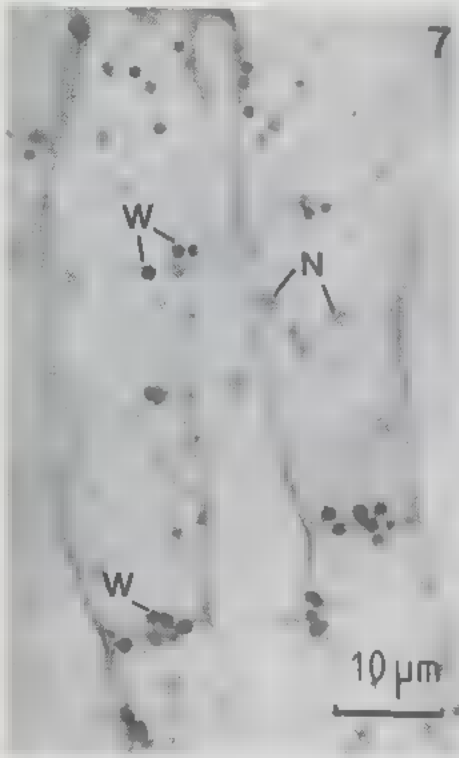


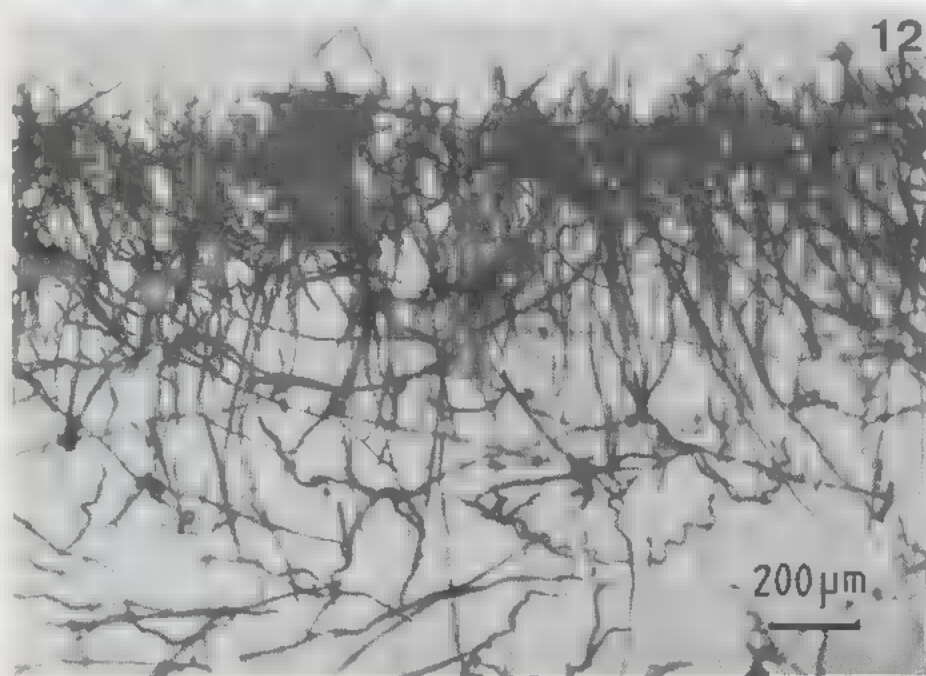
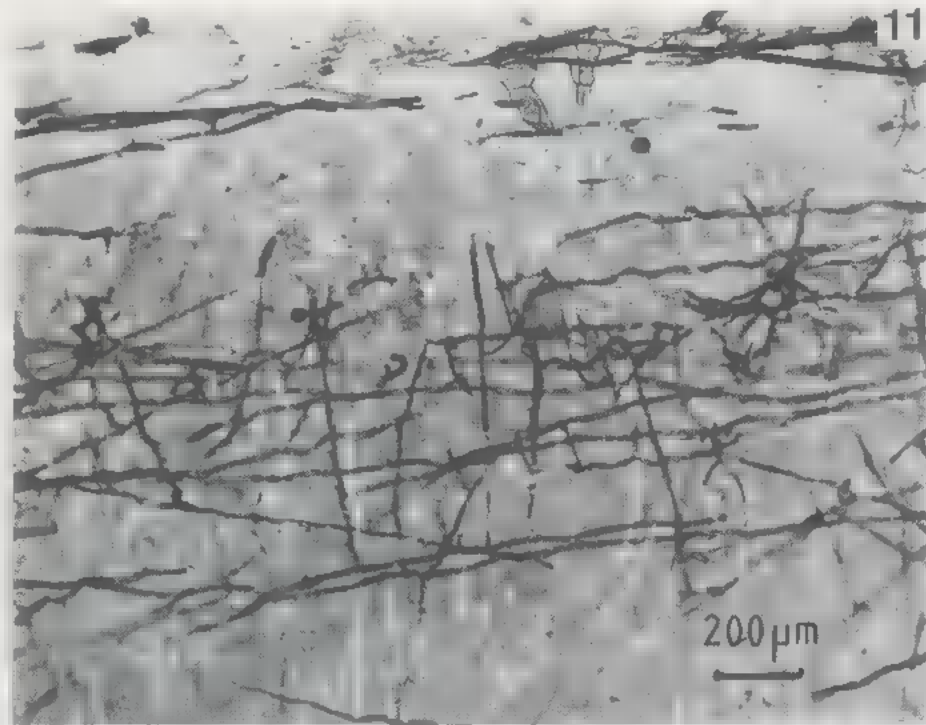
5

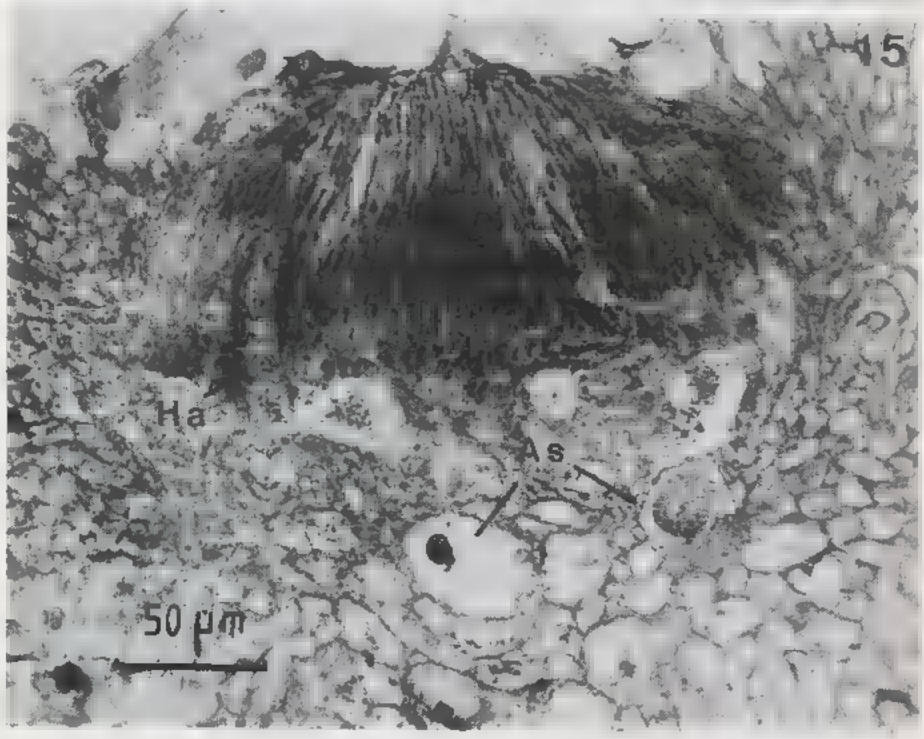
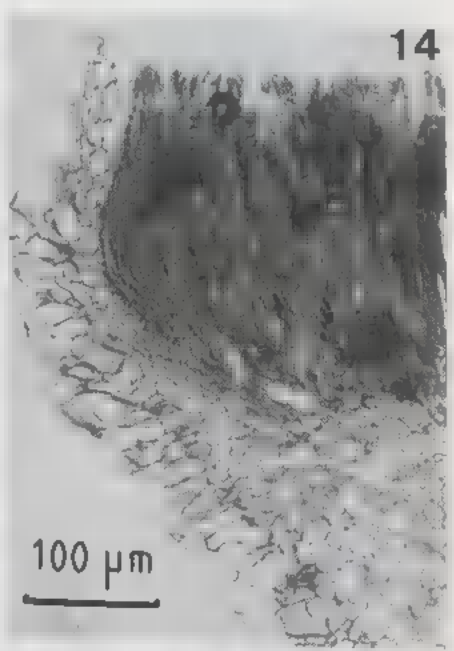
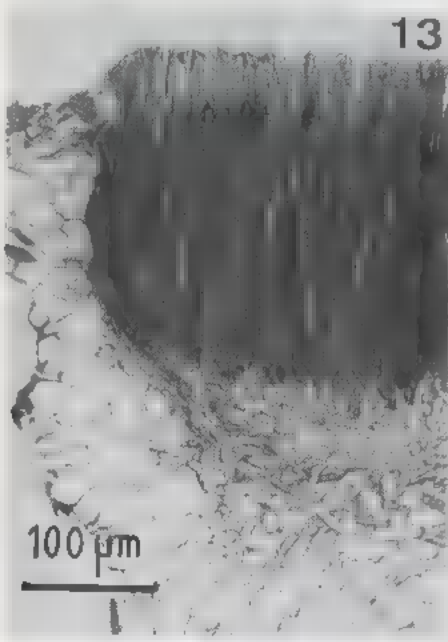


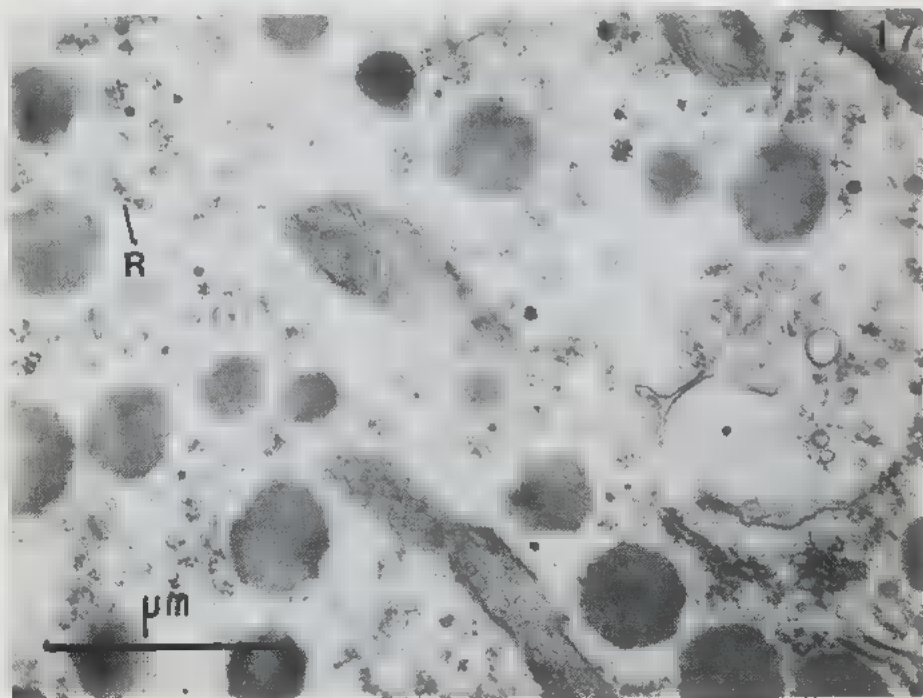
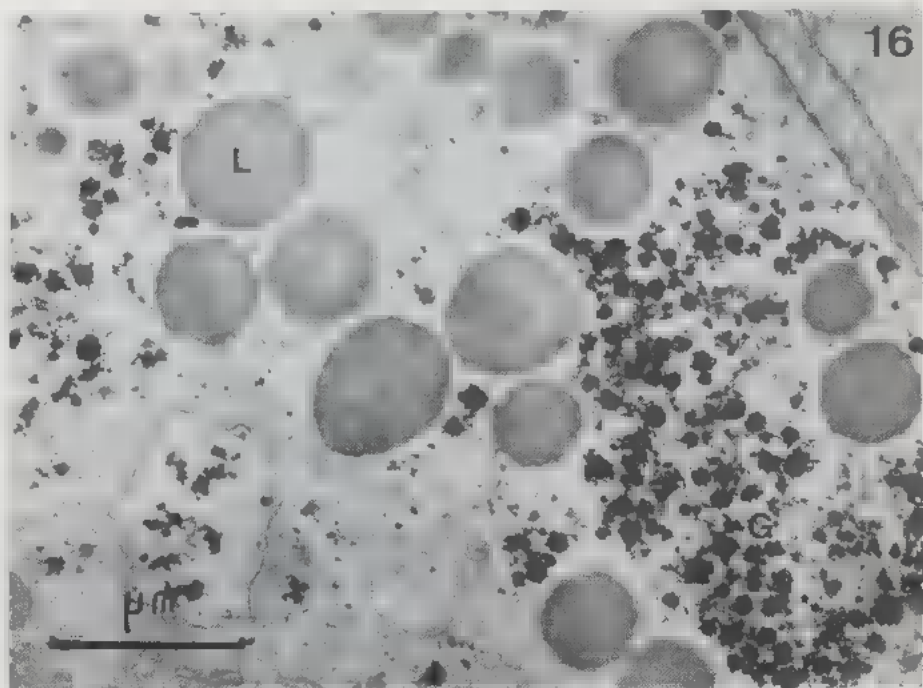
6



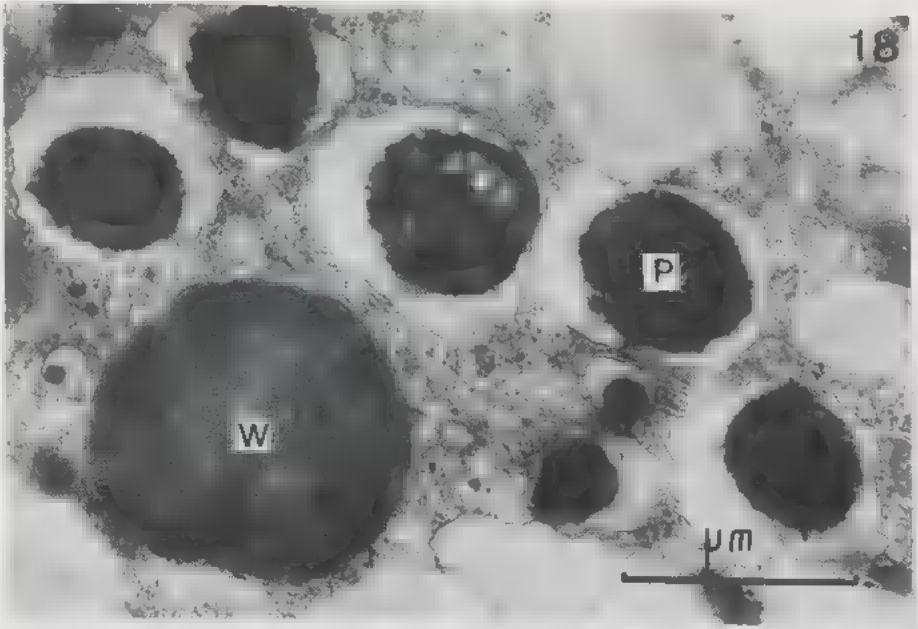




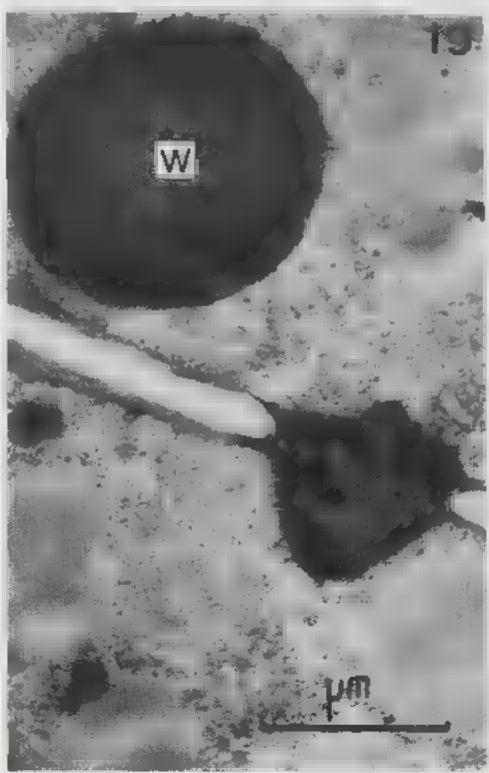




18



19



20

